

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-147992

(43)Date of publication of application : 13.06.1995

(51)Int.Cl.

C12P 21/00

(21)Application number : 05-300493

(71)Applicant : KOBE STEEL LTD

(22)Date of filing : 30.11.1993

(72)Inventor : NISHIMURA KUNIHIRO
KITAOKA YOSHIHISA
NIWANO MITSURU

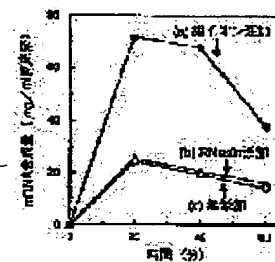
(54) SYNTHESIS OF POLYPEPTIDE WITH CELL-FREE EXTRACT SOLUTION

(57)Abstract:

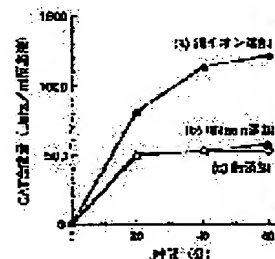
PURPOSE: To provide the inexpensive method capable of reducing the inhibitory action of RNase and of smoothly performing the synthesis of the polypeptide.

CONSTITUTION: In a method for synthesizing a polypeptide by the utilization of a cell-free extract solution, 0.1-1mM of copper ions are added to a reaction solution for synthesizing the polypeptide.

(A)



(B)



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-147992

(43) 公開日 平成7年(1995)6月13日

(51) Int.Cl.⁶

C 1 2 P 21/00

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 9282-4B

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平5-300493

(22) 出願日 平成5年(1993)11月30日

(71) 出願人 000001199

株式会社神戸製鋼所

兵庫県神戸市中央区脇浜町1丁目3番18号

(72) 発明者 西村 剛弘

茨城県つくば市観音台1丁目25番14号 株

式会社神戸製鋼所筑波研究地区内

(72) 発明者 北岡 義久

茨城県つくば市観音台1丁目25番14号 株

式会社神戸製鋼所筑波研究地区内

(72) 発明者 庭野 満

茨城県つくば市観音台1丁目25番14号 株

式会社神戸製鋼所筑波研究地区内

(74) 代理人 弁理士 植木 久一

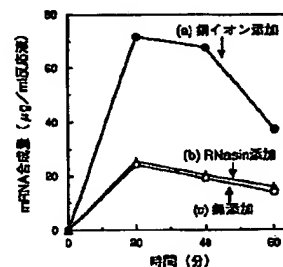
(54) 【発明の名称】 無細胞抽出液を利用したポリペプチドの合成方法

(57) 【要約】

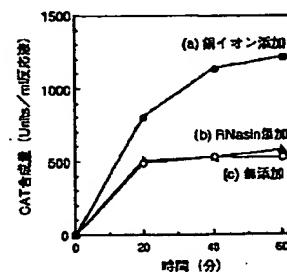
【構成】 無細胞抽出液を利用してポリペプチドを合成する方法において、ポリペプチド合成を行なう反応液に銅イオンを0.1~1mM添加する。

【効果】 RNaseの阻害作用が抑えられ、ポリペプチド合成が円滑に行なわれる。安価である。

(A)



(B)



【特許請求の範囲】

【請求項1】 無細胞抽出液を利用してポリペプチドを合成する方法において、
反応液中に、銅イオンを0.1～1mM添加することを特徴とする無細胞抽出液を利用したポリペプチドの合成方法。

【請求項2】 無細胞抽出液を利用して、DNAからmRNAへの転写およびmRNAからの翻訳を行なってポリペプチドを合成する方法において、
反応の開始時から反応液中に銅イオンを0.1～1mM添加しておくことを特徴とする無細胞抽出液を利用したポリペプチドの合成方法。

【請求項3】 無細胞抽出液を利用して、DNAからmRNAへの転写およびmRNAからの翻訳を行なってポリペプチドを合成する方法において、
反応液中でDNAからmRNAの転写が十分に行なわれた後、該反応液に銅イオンを0.1～1mM添加することを特徴とする無細胞抽出液を利用したポリペプチドの合成方法。

【請求項4】 無細胞抽出液を利用して、mRNAからの翻訳を行なってポリペプチドを合成する方法において、
反応の開始時から反応液中に銅イオンを0.1～1mM添加することを特徴とする無細胞抽出液を利用したポリペプチドの合成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ赤血球などの細胞から調製した無細胞抽出液を利用して行なわれるポリペプチドの合成方法（以下、無細胞タンパク質合成法と称す）に関し、詳細には該合成反応を妨げる方向に働くRNA分解酵素に対して、その作用を選択的に阻害する物質を添加して効率的にポリペプチドを合成する方法に関するものである。上記ポリペプチドとは複数のアミノ酸残基で構成されるものを言い、各種の生理活性ポリペプチドなどが挙げられる。

【0002】 本発明の方法によって合成されたポリペプチドは、主に医療、化学、研究の分野で利用されるものであって、以下の説明においては、ポリペプチドをタンパク質と言うこともある。

【0003】

【従来の技術】 生体内（細胞中）で行われているタンパク質の合成反応は、まず遺伝情報を持つDNAからその情報がmRNAに転写され、そしてタンパク質合成微細器官であるリボソームがそのmRNAの情報を翻訳してタンパク質を合成するという工程で進行している。

【0004】 現在、上記生体の行なっているタンパク質合成反応を試験管等の生体外で行う方法として、これらのタンパク質合成に関与する各種因子やリボソームを生体内から抽出し、これらを用いて試験管内で反応を行な

わせる無細胞タンパク質合成法が活発に研究されている。この方法には、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ赤血球から調製した無細胞抽出液を利用する方法が開発されており、広く用いられている。

【0005】 この無細胞抽出液には、目的タンパク質の合成鑄型としてのDNAもしくはmRNA、及びリボソーム等のタンパク質合成に関与する各種成分が含まれているのは勿論であるが、その他にDNAやmRNAに対する分解酵素も含まれている。このため現状の無細胞タンパク質合成法では、タンパク質合成反応中に上記分解酵素によりDNA、mRNAが分解を受けるということが避けられなかった。

【0006】 この分解のうち特にmRNAは、分解酵素であるRNA分解酵素（以下、RNaseと称す）によって急速に分解されることが知られており、無細胞抽出液中のmRNAが分解されてしまい、タンパク質合成が阻まれる。上記事情はmRNAから出発する合成系のみならず、DNAを鑄型として出発する合成系であっても同様であり、DNA自身はRNaseにより分解されにくくとも、DNAから転写されたmRNAがRNaseによって即座に分解を受けるため、結局タンパク質合成が阻まれることになる。

【0007】 この様な事情から、RNaseの働きを抑制するために、従来ではRNase阻害物質であるポリペプチド性のRNaseインヒビターを添加してRNAの分解を抑え、無細胞タンパク質合成を行なっていた。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、市販されている上記ポリペプチド性RNaseインヒビターはいずれも生体からの精製品であるから非常に高価であり、またいずれのポリペプチド性RNaseインヒビターも特異性が高く、無細胞抽出液に含まれる数種類のRNaseのうち一部のRNaseにのみしか阻害作用を示さないため、費用がかかる割にはRNAの分解を抑えきれないという問題があった。

【0009】 この発明は以上の様な問題に鑑みてなされたもので、無細胞抽出液を利用したポリペプチドの合成を、安価で且つRNaseの阻害作用をほぼ確実に抑えて行なうことのできる方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】 本発明に係る無細胞抽出液を利用したポリペプチドの合成方法は、ポリペプチド合成を行なう反応液に銅イオンを添加して行なうものであり、この反応液中の銅イオン濃度は0.1～1mMとする。

【0011】 また、DNAからmRNAへの転写を行ない、更にmRNAからの翻訳を行なってポリペプチドを合成する系においては、反応開始時から反応液中に銅イオンを0.1～1mM添加するとよい。或はこの系にお

いて、反応液中でDNAからmRNAの転写が十分に行なわれた後、該反応液に銅イオンを0.1~1mM添加すると良い。またmRNAからの翻訳のみの工程でポリペプチドを合成する系においては、反応開始時から反応液中に銅イオンを0.1~1mM添加すると良い。

【0012】

【作用】反応液中に添加した銅イオンは、DNAからmRNAへの転写には影響を与えずRNaseの作用の抑制のみに働く。従って、mRNAがRNaseの分解を受けることがなくなり、ポリペプチド合成の前段階が円滑に進行する。RNaseへの阻害効果は反応液中での銅イオン濃度が0.1mM以上で現われはじめ、1mMを超えて高濃度になるとタンパク質合成反応に悪影響が出はじめて合成効率が落ちる。

【0013】無細胞タンパク質合成法には、①DNAを鋳型とし、DNAからmRNAへの転写と、mRNAからタンパク質への翻訳を同時に行う転写翻訳カップリング法と、②mRNAを鋳型とし、mRNAからタンパク質への翻訳のみを行なう翻訳法の2つの方法がある。

【0014】この2法のうち②の翻訳法は上述の様に、反応液中に銅イオンを添加することによってタンパク質合成が円滑に行なわれるようになるが、①の転写カップリング法では、DNAからmRNAへの転写を司るRNAポリメラーゼのうち一部の種類に対し、本発明の上記好適濃度の銅イオンがその作用を抑制的に作用するということが明らかとなった。勿論銅イオンをより低濃度とすればRNAポリメラーゼの抑制は起こらないが、あまり低濃度であるとRNaseの抑制効果が落ち、本発明の目的が達成されなくなる。

【0015】そこで本発明者らは次の方法を取ることによりこの問題を回避した。即ち、転写が銅イオンによって抑制される場合、例えばT7RNAポリメラーゼやSP6RNAポリメラーゼ等を使用する場合は、反応液中でDNAからmRNAへの転写が十分に行なわれた（通常の反応では10分程度）後に、銅イオンを反応液に添加するという方法である。

【0016】しかし転写が抑制される場合であっても、該転写が銅イオンにより完全に阻害される訳ではなくその程度はわずかである。銅イオンによる転写への影響を無視し、タンパク質合成反応の開始時から反応液中に銅イオンを添加する様にしてもよい。この場合は添加予定量の銅イオンを2分し一部を反応の開始時点から加え、

残部を転写反応が十分に進行してから加えるという方法に変えてもよい。

【0017】尚、転写が銅イオンによって抑制されない場合、例えば大腸菌RNAポリメラーゼ等を使用する場合等は、タンパク質合成反応の開始時から反応液に銅イオンを添加して良いことは言うまでもない。

【0018】②の翻訳法では、上述の様な転写工程が存在しないため、タンパク質合成反応の開始時から銅イオンを添加しても、転写工程の不都合は一切考慮する必要がない。従って反応の、開始時から添加することとすれば最も良い効果が得られる。反応液に添加する銅イオンとしては、酢酸銅、硫酸銅等の銅塩を用いれば良く、またこれらは安価でもある。

【0019】

【実施例】

＜実施例1＞ 転写が銅イオンによって抑制されない場合の転写翻訳カップリング法によるタンパク質合成
大腸菌由来の無細胞抽出液を用い、タンパク質としてクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（以下、CATと称す）を合成した。実施例1はDNAを鋳型として反応を出発させるものであり、転写には大腸菌RNAポリメラーゼが関与する。この大腸菌RNAポリメラーゼは銅イオンによって阻害を受けないものである。

【0020】本実施例1における比較として、（a）銅イオンを添加した場合、（b）ポリペプチド性RNaseインヒビター（プロメガ社製、商品名：RNasin、以下同じ）を添加した場合、（c）ポリペプチド性RNaseインヒビターと銅のいずれも添加しなかった場合のそれぞれについて、タンパク質合成反応を行なった。

【0021】これら（a）～（c）のタンパク質合成反応液は、50μlの反応液をマイクロチューブ内で1時間、37℃に保温することによって行なった。それぞれの反応液としては表1に示した組成のものを使用した。尚、表中に示した無細胞性の大腸菌抽出液は、Zubayらの開発した大腸菌抽出液の調製方法（メソッド・イン・エンザイモロジー、101巻、674~690頁、1983年）に従って調製した。

【0022】

【表1】 -

(a) 銅イオンの添加の場合	(b) RNaseを添加した場合	(c) 無添加の場合
55 mM トリス酢酸 (pH 8.2) 36 mM 酢酸アンモニウム 85 mM 酢酸カリウム 10 mM 酢酸マグネシウム 2 mM ジチオスレイトール 1.5% ポリエチレングリコール (平均分子量 5000) 10 mM ホスホエノールビルビン酸 20 μg/ml フォリン酸 1 mM サイクリックAMP 0.8 mM イソプロピルβ-D-チオ ガラクトピラノシド(IPTG) 0.35mM アミノ酸(L型20種類) 2 mM ATP 0.5 mM GTP、CTP、UTP 0.2 mg/ml 大腸菌転移リボ核酸 10ユニット/ml ビルビン酸キナーゼ 20% 大腸菌抽出物 15 μg/ml DNA	同 左	同 左
0.5 mM 酢酸銅	1000ユニット/ml RNasin	

【0023】合成されたmRNAの量は、合成mRNAに取り込まれた $[3H]$ -UTPの放射能から推定した。また合成されたCATの量は、常法の酵素活性測定方法（例えばメソッド・イン・エンザイモロジー、43巻、737頁、1975年参照）によって測定し、これをもって合成量とした。

【0024】これらの合成量の経時変化を図1に示す。図1の(A)はmRNA合成量であり、転写合成された後RNaseにより分解されずに残っているmRNAである。図1の(B)はタンパク質、即ちCATの合成量である。

【0025】(a)は銅イオンをタンパク質合成反応の開始時から反応液に添加したものであるが、図1(A)に見られる様に、(c)の無添加の場合に比べ銅イオンの添加により著しくmRNA量が多いことが分かる。また図1(B)に見られる様に、合成されるCATの量に関しても、(c)無添加に比べ、(a)銅イオン添加のものは合成量が約2倍と多くなることが分かる。これは銅イオンの添加により、多くのmRNAが分解されずに残るためであると考えられる。

【0026】また図1から(a)銅イオン添加のmRNAやCATの合成量は、(b)ポリペプチド性RNAs

e インヒビターと比較してもはるかに多く、ポリペプチド性RNAase インヒビターよりはるかに有効に銅イオンが作用するということが分かる。

【0027】<実施例2> 転写が銅イオンによって抑制される場合の転写翻訳カップリング法によるタンパク質合成

大腸菌由来の (a) 無細胞抽出液と T7 RNA ポリメラーゼを用い、無細胞タンパク質合成を行なった。この実施例 2 は DNA を鋳型としており、タンパク質として C A T を合成するものである。この場合の転写は T7 RNA ポリメラーゼによって行なわれ、この T7 RNA ポリメラーゼは銅イオンによって阻害されるものである。

【0028】本実施例2における比較として、(a)銅イオンを反応開始後10分で添加した場合、(b)ポリペプチド性RNaseインヒビターを添加した場合、(c)ポリペプチド性RNaseインヒビターと銅のいずれも添加しなかった場合についてタンパク質合成反応を行なった。タンパク質合成反応で用いた各反応液の組成は表2に示す通りである。

【0029】

【表 2】

(a) 銅イオンの添加の場合	(b) RNaseを添加した場合	(c) 無添加の場合
55mM トリス酢酸 (pH 8.2) 36mM 酢酸アンモニウム 85mM 酢酸カリウム 10mM 酢酸マグネシウム 2mM ジチオスレイトール 1.5% ポリエチレングリコール (平均分子量 6000) 10mM ホスホエノールビルビン酸 20 μ g/ml フォリン酸 0.35mM アミノ酸 (L型20種類) 2mM ATP 0.5mM GTP、CTP、UTP 0.2mg/ml 大腸菌転移リボ核酸 10ユニット/ml ビルビン酸キナーゼ 1000ユニット/ml T7RNAポリメラーゼ 20% 大腸菌抽出物 15 μ g/ml DNA	同	同
0.5mM 酢酸銅	1000ユニット/ml RNasin	

【0030】尚、タンパク質合成反応における反応条件、mRNA、CATの測定方法等は、実施例1の場合と同じとした。図2にmRNA及びCATの合成量の経時変化を示す。図2の(A)はmRNA合成量であり、図2の(B)はCAT合成量である。

【0031】図2から分かる様に、銅イオンをタンパク質合成反応開始10分後に反応液に添加することで、

(c) 無添加に比べ、多量のmRNA及びCATが合成されている。これは銅イオン添加後、mRNAがRNaseによって分解されずに多く残っているため、またそれに伴ってタンパク質合成量も増加したためである。銅イオン添加効果は、(b) ポリペプチド性RNaseインヒビターを添加した場合と比べてもはるかに大きく、銅イオンが有効にRNaseを阻害しているということ

20

が分かる。

【0032】＜実施例3＞ 翻訳法によるタンパク質合成

大腸菌由来の無細胞抽出液を用い、無細胞タンパク質合成法を行なった。この実施例3ではmRNAを鋳型としており、CATを合成した。

【0033】実施例3における比較として、(a) 銅イオンを添加した場合、(b) ポリペプチド性RNaseインヒビターを添加した場合、(c) ポリペプチド性RNaseインヒビターと銅のいずれも添加しなかった場合について、タンパク質合成反応を行なった。このタンパク質合成反応を実施した反応液の組成を表3に示す。

【0034】

【表3】

40

【0035】本実施例3でのタンパク質合成反応の反応条件、CATの測定方法等は、実施例1の場合と同じとした。図3にCAT合成量の経時変化を示す。図3から分かる様に、(a)銅イオン添加の場合は、(c)無添加の場合に比べ、約2倍もの多くのCATが合成された。これは銅イオンをタンパク質合成反応開始時から反応液に添加することによって、多くのmRNAが分解されずに残り、従って合成されるCATの量が多くなったものと考えられる。また銅イオン添加の場合はポリペプチド性RNAaseインヒビターを添加した場合よりもはるかに多くのCATを合成しており、銅イオンが有効であることが、この実施例3からも分かる。

【0036】

【発明の効果】本発明に係る無細胞抽出液を利用したポ

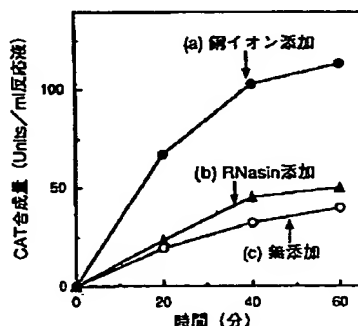
【図面の簡単な説明】

【図1】転写が銅イオンによって抑制されない場合の転写翻訳カップリング法におけるmRNA, CAT合成量のグラフである。

【図2】転写が銅イオンによって抑制される場合の転写翻訳カップリング法におけるmRNA、CAT合成量のグラフである。

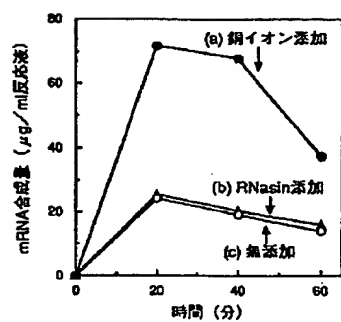
【図3】 翻訳法におけるCAT合成量のグラフである。

【图3】

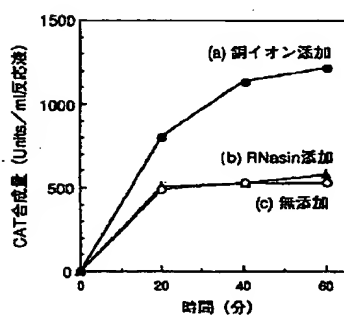


【図1】

(A)

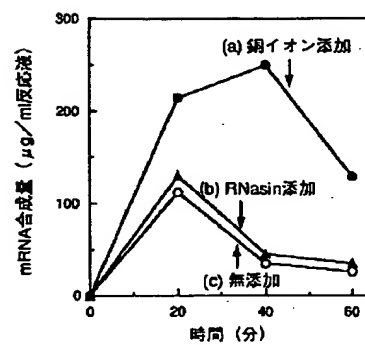


(B)



【図2】

(A)



(B)

